

## 高血圧自然発症ラット (SHR) を用いた精巣内血管障害の 精子発生能障害に及ぼす影響に関する研究

赤 樫 圭 吾 熊 本 悦 明 伊 藤 直 樹

札幌医科大学医学部泌尿器科学教室 (主任 熊本悦明 教授)

### Effects of Intratesticular Hypertensive Vascular Changes on Spermatogenesis in Spontaneously Hypertensive Rat (SHR)

Keigo AKAGASHI, Yoshiaki KUMAMOTO and Naoki ITOH

*Department of Urology, Sapporo Medical University School of Medicine*

*(Chief : Prof. Y. KUMAMOTO)*

**ABSTRACT** In male infertility and in elderly males, it is thought that intratesticular vascular changes contribute to hypospermatogenesis. We employed spontaneously hypertensive rats (SHR) for investigations of the process of hypospermatogenesis induced by vascular changes. We also examined the changes of spermatogenesis by preventive administration of a Ca channel blocker, nifedipine. Sprague-Dawley rats (SDR), used as the control, showed blood pressure of about 130 mmHg, whereas SHR showed elevation of blood pressure even at 8 weeks of age and showed about 190 mmHg from 16 weeks of age. Hypertensive vascular changes developed in intratesticular arteries, especially in arterioles. Although the mature spermatid count/Sertoli cell count of the SDR group was 6.89 at 24 weeks of age, 6.71 at 36 weeks of age, that of the SHR non-treated group was 4.28 at 24 weeks of age, 4.05 at 36 weeks of age, both significantly lower than that of the SDR group. The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive cell count/Sertoli cell count, employed as the index of DNA synthesis of germ cells, did not differ among the groups. There were no differences of transferrin concentration in testicular cytosol, which was secreted by Sertoli cells in the testis. In contrast, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which was also secreted by Sertoli cells, in the SHR non-treated group, was significantly decreased at 36 weeks of age, suggesting Sertoli cell dysfunction. The degree of hypertensive vascular changes in the nifedipine-treated SHR group was significantly lower than that of the SHR non-treated group at 24 and 36 weeks of age. Spermatogenesis and the IGF-1 concentration in the SHR nifedipine-treated group remained at the same level as the SDR group throughout the experimental period.

In conclusion, it could be clarified that spermatogenic damage caused by hypertensive vascular changes was mediated by Sertoli cell dysfunction. Nifedipine has the possibility would prevent the development of hypertensive vascular changes and, as a result, protect spermatogenesis.

(Received December 26 1994 and accepted January 18, 1995)

**Key words:** Spontaneously hypertensive rat (SHR), Spermatogenesis, Nifedipine,  
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

---

#### Abbreviations:

SDR : Sprague-Dawley Rat

SHR : Spontaneously Hypertensive Rat

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

IGF-1 : Insulin-like growth factor-1

## 1 緒 言

高齢者において精巣内に種々の組織学的変化が起こることに関しては既に多くの報告がある。精細管では精細管壁の内腔へのヘルニア状突出, myoid cell 周囲への collagen 等の沈着による精細管壁の肥厚, 精細胞の減少, 精細管の硝子化が認められ, 間質においても Leydig 細胞の膨化, 色素沈着等の組織変化が生じている<sup>1-5)</sup>。さらに精巣内動脈においても壁の肥厚, 内腔の狭窄, 閉塞といった動脈硬化性変化, 精巣内毛細血管の減少等の変化も認められる<sup>6-7)</sup>。

高齢者における精細管の硝子化や精細胞数の減少等の変化は動脈支配の関係上遠位の精巣上極や後方で最も進行している<sup>6-8)</sup>。このような事実を分析してみると高齢者での精子発生能の低下の原因として精巣内動脈の動脈硬化に伴う虚血や栄養供給低下が関与していることが予想される。一方, 男子不妊症にみられる精子発生能障害も, 同時に精巣内動脈に硝子化<sup>9)</sup>や内皮細胞下の沈着物による狭窄<sup>9)</sup>が合併していることがある。

そして実際に血流障害を起こし精子発生能障害がどのように発生するか実験的研究も行われている<sup>10-12)</sup>。しかしそれらは精巣動脈結紮あるいはクランプにより発生する精子発生能の変化を組織学的に検討した急性の虚血実験であり<sup>10-12)</sup>、ヒトにおける長期に亘り徐々に起こると予想される血管障害による精子発生能障害の発生機序の解明には必ずしも妥当とはいえない可能性がある。

そこで我々はより臨床的血管障害に近い血管障害を発症し得る高血圧自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive Rat; SHR) を用いての検討を試みた。SHR は高血圧性血管障害を生じ得る実験モデルであり, 精巣内血管障害に伴う精子発生能障害を組織学的また生化学的に検討することにより, 自然な慢性血管障害による血流障害に伴う精子発生能障害を実験的に分析しうるものと考えた。またさらにその様な血管障害を予防するため末梢血管拡張作用の強い Ca 拮抗剤である nifedipine を予防投与することで, その血管障害性精子発生能障害がどの様に予防し得るものか治療学的検討も試みたので報告する。

## 2 材料及び方法

### 2.1 材 料

SHR 及び対照群として Sprague-Dawley rat (SDR) を用い検討した。SHR は 2 群にわけ 1 群は無処置群, 1 群は nifedipine を生後 4 週より 20 mg/kg/day 経口

投与した nifedipine 投与群である。全例 4 週に 1 度 tail-cuff 法にて血圧を測定しその推移を追跡した。

SDR 群, 無処置 SHR 群, nifedipine 投与 SHR 群の 3 群とも生後 12 週, 24 週, 36 週で 5 匹ずつ屠殺し両側精巣を摘出した。右側精巣は Bouin 液固定の後パラフィン包埋し Hematoxylin-Eosin 及び Azan 染色を施し組織学的検討に供した。左側精巣は -20°C にて凍結保存し精巣組織 cytosol 中 transferrin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 測定に供した。

屠殺時採血し血清を分離し凍結保存し血清 testosterone 値を測定した。

なお SDR と Wistar-Kyoto rat は 36 週齢において精子発生能に差がないことを確認した。

### 2.2 方 法

#### 2.2.1 精巣内動脈障害の発生率

精巣組織標本内の全動脈を [半径 35  $\mu$ m 以下の細動脈 (arteriole)] と [半径 35~70  $\mu$ m の小動脈 (small artery)] に分類し, 高血圧性変化を呈した動脈数の全動脈数に占める割合を算出した。

高血圧性変化には内膜の浮腫等の軽度の変化から fibrinoid 変性, 硝子化といった重度の変化まで存在するが, 判別が困難な場合があるためその変化の程度については分別しなかった。この様な高血圧性変化に伴い血流の低下が生じ, 脳卒中等の実質臓器障害が発生する。精巣においても同様に臓器障害が発症すると予測され, その障害の程度を組織学的, 生化学的に検討した。

#### 2.2.2 精巣組織の病理組織学的検討

##### 2.2.2.1 Germinal Cell Index (GCI) 及び Spermatogenic curve

光顕的に無作為に 2 種類の spermatid (steps 1~7 及び steps 15~19) を含む stages I~VII の精細管で切断面が円形に近いものを 20 個選び, 各精細管について各成熟段階の精細胞及び Sertoli 細胞を数え, 1 Sertoli 細胞当たりの全精細胞数を算出し, total GCI<sup>13)</sup> とした。

また各成熟段階の精細胞についても total GCI 同様に 1 Sertoli 細胞当たりの各精細胞数を算出した。そしてそれをグラフにプロットし線で結んだ Spermatogenic curve<sup>14)</sup> を作成した。その Spermatogenic curve は精子発生能障害の総合的パターンを示すものといえる。なお精細胞成熟段階を以下のごとく分類した。

a) spermatogonia: A 型, intermediate 型 (I 型), B 型 spermatogonia

b) primary spermatocyte: leptotene 及び pachytene spermatocyte

c) immature spermatid: steps 1~7 spermatid

d) mature spermatid: steps 15~19 spermatid

### 2・2・2・2 Germinal Cell Ratio

精細胞の成熟過程は spermatogonia より primary spermatocyte へと分化する mitosis の過程, primary spermatocyte より secondary spermatocyte, immature spermatid へと分化する meiosis の過程, さらに mature spermatid へと成熟する spermiogenesis の過程に大別される。そこでまず, 1 spermatogonia からいくつの mature spermatid が発生するか, mature spermatid 数/spermatogonia 数を算出し Spermatogenic Ratio とした。さらに各段階における分化, 成熟の程度を表す指標として各段階の前後の精細胞数の比を算出した。すなわち primary spermatocyte 数/spermatogonia 数, immature spermatid 数/primary spermatocyte 数, mature spermatid 数/immature spermatid 数を算出し, それぞれを Mitotic Ratio, Meiotic Ratio, Spermiogenic Ratio とした。これらの精細胞数比を総称して Germinal Cell Ratio とした。

### 2・2・2・3 PCNA Labelig Index: DNA 合成能

ラットにおいては DNA 合成を行なっている精細胞は A1 型, A2 型, A3 型, A4 型, I 型, B 型 spermatogonia である。そこで精巣組織を DNA 合成期に核内で合成される proliferating cell nuclear antigen (PCNA) に対する monoclonal 抗体を用い Avidin Biotin Complex 法により染色し, 以下の検討を行った。

PCNA 陽性細胞を含む精細管 20 個について PCNA 陽性細胞数の Sertoli 細胞数に対する比を算出し PCNA Labeling Index とした。

### 2・2・3 血清 testosterone の測定

血清 testosterone 値はヒト血清 total testosterone 測定用 kit (日本 DPC 社製) を用い測定した。

### 2・2・4 精巣組織 cytosol 中 transferrin 及び insulin-like growth factor 1 (IGF-1) の測定

#### 2・2・4・1 精巣組織 cytosol 分画の分離

摘出後  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した左精巣を解凍後 0.01 M Tris buffer, 50 mM phenylmethylsulfonyl fluoride の 49:1 混合液中で白膜, 血管を除去し細断した。約 3 倍量の前述した混合液を加えホモジナイズした。さらに血球除去のために 1500 rpm, 10 分間遠心分離し上清を捨て, 3 倍量の buffer を加え同じ操作を 3 度繰り返した。そして 105000 g で 1 時間超遠心し上清を cytosol として得た。

#### 2・2・4・2 精巣 cytosol 中 transferrin 濃度測定

Cytosol 中 transferrin は Skinner の方法<sup>15)</sup> で RIA にて測定した。Cytosol 中蛋白濃度は Bradford 法<sup>16)</sup> にて測定した。

#### 2・2・4・3 精巣 cytosol 中 IGF-1 濃度測定

IGF-1 は human IGF-1 kit (Amersham 社製) を用い Spiteri-Grech らの方法<sup>17)</sup> にて測定した。

### 2・2・5 統計学的分析

2 群間の検定には Mann-Whitney U 検定を用い  $P < 0.05$  を有意と判定した。

## 3 結 果

### 3・1 体重当たりの精巣重量の比較

3 群間で 12, 24, 36 週齢で摘出した精巣重量/体重比は有意な差を認めなかった (Table 1)。

### 3・2 収縮期血圧の変動の比較

SDR 群は全経過を通じて 130 mmHg 前後の血圧を呈した。無処置 SHR 群は 8 週より血圧が上昇し, 16 週以降は約 190 mmHg の一定の血圧を呈した (Fig. 1)。Nifedipine 投与 SHR 群は徐々に血圧の上昇を認め, 12 週以降 SDR 群に比し有意に高値を呈したが, 無処置 SHR 群と比較すると 8 週以降有意に血圧の上昇は抑制されていた。

### 3・3 精巣内動脈の高血圧性血管障害の各群間の比較

半径 35~70  $\mu\text{m}$  の精巣内小動脈 (small artery) は

Table 1 Comparison of the weight of testes in the different group

		12 week-old		24 week-old		36 week-old	
		Right	left	Right	left	Right	left
SDR group	(n=5)	0.37 $\pm$ 0.01	0.37 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.01
SHR non-treated group	(n=5)	0.38 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.01	0.40 $\pm$ 0.04	0.29 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.05
SHR nifedipine treated group	(n=5)	0.41 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.01

Values are expressed as mean  $\pm$  S. E.

(g/100 g body weight)

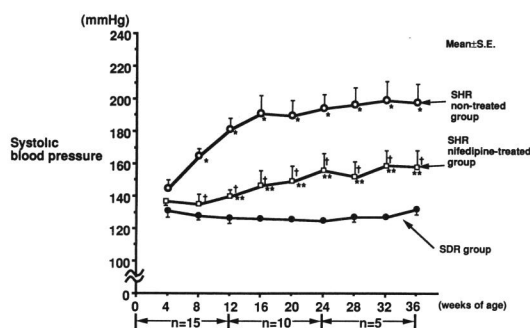


Fig. 1 Changes of systolic blood pressure in each group

\*\*\*  $p < 0.01$  (compared with SDR group at same age)

†  $p < 0.01$  (compared with SHR non-treated group at same age)

Table 2 に示すように SDR 群では全く血管障害が発生しなかったが、無処置 SHR 群では 12 週齢より、nifedipine 投与 SHR 群では 24 週齢より高血圧性血管障害が発生した。しかしいずれも有意な差ではなかった。半径  $35 \mu\text{m}$  以下の精巣内細動脈 (arteriole) では 24, 36 週齢で SHR 両群は Fig. 2 に示したような硝子化等の高血圧性血管障害を高率に認めた。その発生率を比較すると SDR に比し有意に上昇していた (Table 2)。また 24 週齢を除いて nifedipine 投与 SHR 群は無処置 SHR 群に比し精巣内細動脈における高血圧性血管障害の発生率が有意に低値を示した。

### 3・4 精子発生能障害の比較

#### 3・4・1 GCI の比較検討

Table 3 に示すように SDR 群では各成熟段階の精細胞 GCI は経過中有意な変動を示さなかった。無処置 SHR 群では 12 週齢においては SDR 群と各精細胞の GCI は差を認めなかったが、24, 36 週齢では Mature Spermatid Index が SDR 群に比し有意に低下してい



Fig. 2 Intratesticular arterioles of 36 week-old-no treated SHR (stained with Azan,  $\times 240$ )

た。一方 nifedipine 投与 SHR 群の各精細胞の GCI は各週齢で SDR 群と差を認めず、24 週齢及び 36 週齢では Mature Spermatid Index が無処置 SHR 群に比し有意に高値を示した。

Total GCI を比較検討すると 12 週齢では 3 群間に有意な差を認めなかったが、24 週齢以降無処置 SHR 群が SDR 群に比し低い傾向があったが有意の差ではなかった (Table 3)。Nifedipine 投与 SHR 群ではいずれの週齢においても SDR 群とほぼ同様の値を呈し、精子発生能障害の発生が予防されたことが推察された (Table 3)。

36 週齢の SDR 群及び無処置 SHR 群の実際の精巣組織所見を Fig. 3 に示すが、SDR はほぼ正常の精細管所見を呈しているのに対し、無処置 SHR 群の精細管は直径が低下し mature spermatid が消失している。

なお無処置 SHR 群の Mature Spermatid Index は 24 週齢で  $4.28 \pm 1.12$ , 36 週齢で  $4.05 \pm 1.10$  と比較的 S. E. 値が大きく、個々のラットの精細胞障害に差があることが推察された。そこで無処置 SHR 群の個々のラットの Spermatogenic curve を比較検討した (Fig. 4)。12 週齢では各ラット間でほとんど個体差は認めら

Table 2 The degree of hypertensive vascular changes in intratesticular small arteries and arterioles

			12 week-old	24 week-old	36 week-old
Small artery ( $35 \sim 70 \mu\text{m}$ in radius)	SDR group	(n=5)	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$
	SHR non-treated group	(n=5)	$1.5 \pm 1.5$	$3.8 \pm 2.3$	$6.5 \pm 3.8$
	SHR nifedipine treated group	(n=5)	$0.0 \pm 0.0$	$3.6 \pm 2.2$	$6.5 \pm 3.5$
Arteriole ( $\leq 35 \mu\text{m}$ in radius)	SDR group	(n=5)	$3.9 \pm 1.3$	$7.0 \pm 1.9$	$3.4 \pm 1.5$
	SHR non-treated group	(n=5)	$15.6 \pm 1.0$	$27.0 \pm 4.0$	$30.6 \pm 6.9$
	SHR nifedipine treated group	(n=5)	$6.4 \pm 1.2$	$17.4 \pm 2.8$	$12.6 \pm 1.5$

\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$

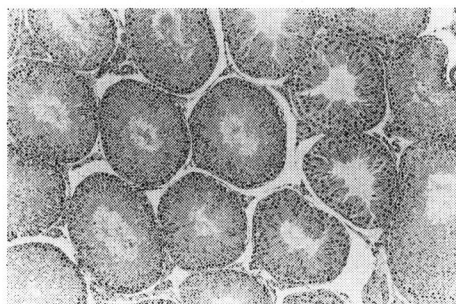
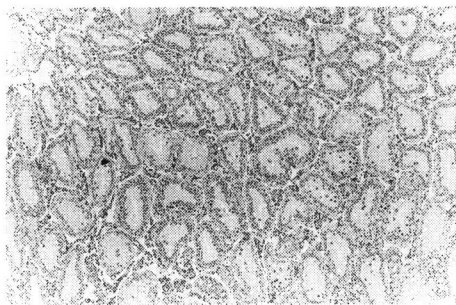
Values are expressed as mean  $\pm$  S. E.

**Table 3** Numbers of germ cells per Sertoli cells (Germinal Cell Index) in each group

			12 week-old	24 week-old	36 week-old
Spermatogonia Index	SDR group	(n=5)	1.70±0.06	1.55±0.03	1.40±0.07
	SHR non-treated group	(n=5)	1.53±0.08	1.24±0.06	1.37±0.09
	SHR nifedipine treated group	(n=5)	1.60±0.10	1.70±0.13	1.47±0.06
Primary Spermatocyte Index	SDR group	(n=5)	2.42±0.10	2.33±0.12	2.18±0.05
	SHR non-treated group	(n=5)	2.51±0.10	2.47±0.08	1.86±0.42
	SHR nifedipine treated group	(n=5)	2.47±0.08	2.50±0.12	2.17±0.08
Immature Spermatid Index	SDR group	(n=5)	6.57±0.17	6.28±0.04	6.01±0.28
	SHR non-treated group	(n=5)	6.37±0.11	4.41±1.14	4.79±1.23
	SHR nifedipine treated group	(n=5)	6.70±0.32	6.20±0.13	6.06±0.17
Mature Spermatid Index	SDR group	(n=5)	6.86±0.40	6.89±0.13	6.71±0.10
	SHR non-treated group	(n=5)	6.80±0.09	4.28±1.12	4.05±1.10
	SHR nifedipine treated group	(n=5)	6.93±0.33	6.43±0.65	6.59±0.31
Total GCI	SDR group	(n=5)	17.55±0.45	17.05±0.21	16.30±0.39
	SHR non-treated group	(n=5)	17.21±0.08	12.40±2.83	12.07±2.82
	SHR nifedipine treated group	(n=5)	17.69±1.02	16.83±0.86	16.28±0.69

\* p&lt;0.05    \*\* p&lt;0.01

Values are expressed as mean ± S. E

**Fig. 3-1** Histological aspects of testis of SDR at 36 weeks of age (stained with H-E, ×118)**Fig. 3-2** Histological aspects of testis of non-treated SHR at 36 weeks of age (stained with H-E, ×118)

れず、全例の各精細胞の GCI が SDR 群の mean±2 S. D. に含まれていた。しかし、24 週齢及び 36 週齢では一例を除き spermatogonia, primary spermatocyte はほぼ SDR 群の mean±2 S. D. の範囲に入っていたが、Mature Spermatid Index は正常以下へ障害されているものが多数を占めた。また 24 週齢、36 週齢では各一匹で primary spermatocyte 以降の成熟した精細胞がほとんど消失していた。このような無処置 SHR 群における個体差の原因を探るため期間中の最高収縮期血圧及び高血圧性血管障害の発生頻度と mature spermatid の関係について検討してみた。Fig. 5 に示す如くいずれの関係も有意な負の相関を示し、mature spermatid が消失しているラットでは期間中最高血圧、高血圧性血管障害の発生頻度が高いことが明らかとなった。したがって 24 週齢、36 週齢のラット間の精子発生能障害の個体差は血圧及び血管障害の発生頻度に差が生じていたことに起因すると考えられた。

#### 3・4・2 Germinal Cell Ratio の比較検討

まず Spermatogenic Ratio は 12 週齢では 3 群間で差を認めなかった (Table 4)。しかし、24 週齢及び 36 週齢においては無処置 SHR 群では SDR 群に比し有意に低下していた。また nifedipine 投与 SHR 群は各週齢において SDR 群と差を認めず、36 週齢で無処置 SHR

Table 4 Comparative efficacy of each phase of spermatogenesis using Germinal Cell Ratio

			12 week-old	24 week-old	36 week-old
Spermatogenic Ratio (Mature spermatid/spermatogonia)	SDR group	(n=5)	4.06±0.31	4.45±0.12	4.85±0.28
	SHR non-treated group	(n=5)	4.50±0.25	3.04±0.78	2.81±0.74
	SHR nifedipine treated group	(n=5)	4.36±0.20	3.86±0.42	4.49±0.15
Mitotic Ratio (Primary spermatocyte/spermatogonia)	SDR group	(n=5)	1.42±0.04	1.50±0.08	1.56±0.12
	SHR non-treated group	(n=5)	1.67±0.09	1.22±0.27	1.30±0.28
	SHR nifedipine treated group	(n=5)	1.56±0.08	1.48±0.08	1.49±0.08
Meiotic Ratio (Immature spermatid/primary spermatocyte)	SDR group	(n=5)	2.73±0.07	2.72±0.12	2.80±0.17
	SHR non-treated group	(n=5)	2.55±0.10	2.14±0.54	2.14±0.54
	SHR nifedipine treated group	(n=5)	2.72±0.13	2.53±0.16	2.80±0.09
Spermiogenic Ratio (Mature spermatid/immature spermatid)	SDR group	(n=5)	1.05±0.08	1.10±0.05	1.13±0.07
	SHR non-treated group	(n=5)	1.07±0.03	0.96±0.05	0.84±0.06
	SHR nifedipine treated group	(n=5)	1.04±0.05	1.03±0.07	1.09±0.04

\* p&lt;0.05

Values are expressed as mean ± S. E.

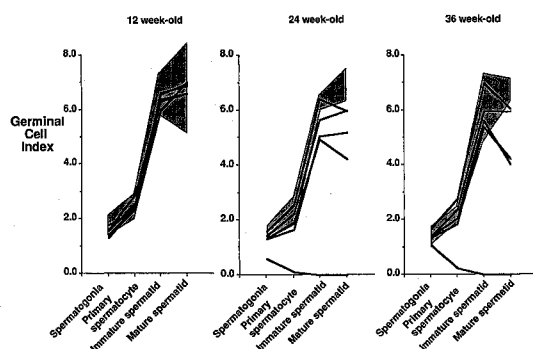


Fig. 4 Comparison of spermatogenic curve in individual rat of SHR non-treated group. Shaded area indicated mean ± 2 S. D. of SDR group.

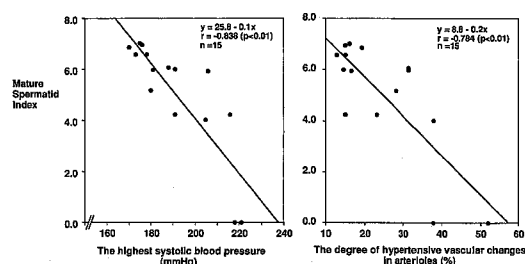


Fig. 5 Relation between Mature Spermatid Index and the highest blood pressure, and relation between Mature Spermatid Index and the degree of hypertensive vascular changes in arterioles in SHR non-treated group.

群に比較して有意に高値を呈した。

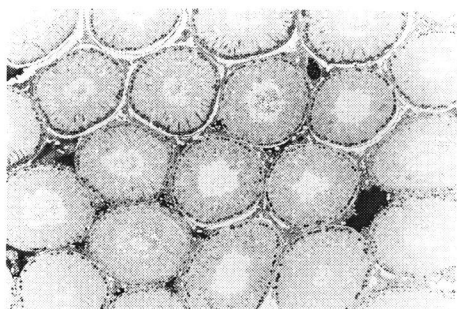
各成熟段階における精細胞比を3群間で比較すると Mitotic Ratio と Meiotic Ratio は各週齢で差を認めなかった (Table 4)。しかし Spermiogenic Ratio は36週齢の無処置 SHR 群で SDR 群に比し有意に低値を示した。すなわち高血圧性血管障害に伴う精子発生能障害は spermiogenesis の過程に強く出現する可能性が示唆された。Nifedipine 投与 SHR 群は各週齢において SDR 群と差を認めなかった。

### 3・4・3 PCNA Labeling Index の比較

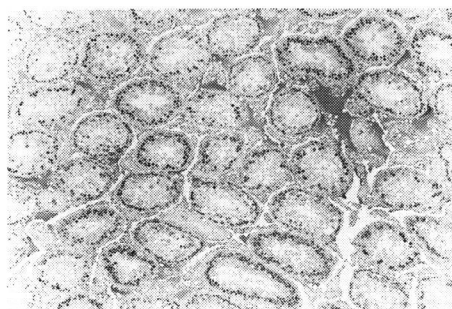
Fig. 6 は抗 PCNA monoclonal 抗体で染色を施した精巣組織である。無処置 SHR 群は SDR 群に比較し成熟した精細胞は減少しているが (Fig. 6-2), PCNA 陽性細胞数は Fig. 6-1 に示した SDR 群と同程度認められた。これを定量的に評価するため PCNA Labeling Index を用い比較検討すると各週齢, 各群間で差を認めなかった (Table 5)。

### 3・5 血清中 total testosterone 値の比較

Table 6 に示した様に SDR 群は12週齢に比し24週齢以降で上昇する傾向を認めた。無処置 SHR 群は実験期間中大きな変動を認めなかった。Nifedipine 投与 SHR 群では24週齢にて0.956 ng/ml とやや高値を呈した。3群間で比較検討すると無処置 SHR 群が24週齢及び36週齢で低い傾向を認めたが、SDR 群とは有意な差を認めなかった。Nifedipine 投与群は24週齢で無処置 SHR 群に比し高値を示した。



**Fig. 6-1** Immunohistochemical staining of SDR testis at 36 weeks of age with monoclonal anti-PCNA antibody (×118)



**Fig. 6-2** Immunohistochemical staining of SHR non-treated group testis at 36 weeks of age with monoclonal anti-PCNA antibody (×118)

**Table 5** Comparison of PCNA Labeling Index

		12 week-old	24 week-old	36 week-old
SDR group	(n=5)	2.20±0.11	1.95±0.07	1.83±0.07
SHR non-treated group	(n=5)	2.01±0.05	1.59±0.41	1.93±0.04
SHR nifedipine treated group	(n=5)	2.07±0.06	1.95±0.08	1.85±0.07
Values are expressed as mean ± S. E.				(%)

**Table 6** Comparison of serum total testosterone level in the different group

		12 week-old	24 week-old	36 week-old
SDR group	(n=5)	0.224±0.063	0.525±0.043	0.519±0.173
SHR non-treated group	(n=5)	0.377±0.174	0.254±0.111	0.292±0.124
SHR nifedipine treated group	(n=5)	0.556±0.128	0.956±0.438	0.620±0.092
* p<0.05				(ng/ml)

Values are expressed as mean ± S. E.

**Table 7** Transferrin and Insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentration in testicular cytosol

			12 week-old	24 week-old	36 week-old
Transferrin (μg/mg protein)	SDR group	(n=5)	1.53±0.32	1.92±0.36	2.07±0.25
	SHR non-treated group	(n=5)	1.87±0.12	1.17±0.04	1.72±0.07
	SHR nifedipine treated group	(n=5)	1.26±0.04	1.48±0.06	1.71±0.08
IGF-I (ng/mg protein)	SDR group	(n=5)	1.71±0.25	2.03±0.24	1.83±0.20
	SHR non-treated group	(n=5)	1.40±0.10	1.35±0.24	1.19±0.19
	SHR nifedipine treated group	(n=5)	1.39±0.17	1.55±0.08	1.71±0.16

\* p<0.05

Values are expressed as mean ± S. E.

### 3・6 精巣 cytosol 中 transferrin 濃度の比較

Table 7 に示したように各週齢とも 3 群間で有意な差は認めなかった。また加齢に伴う明らかな傾向も認めなかった。

### 3・7 精巣 cytosol 中 IGF-1 濃度の比較

SDR 群においては期間中ほぼ一定の値を示した。無処置 SHR 群ではいずれの週齢も SDR 群に比しやや低値を示したが 36 週齢のみ有意に低値であった (Table 7)。Nifedipine 投与 SHR 群はいずれの週齢においても SDR 群と有意な差を認めず、36 週齢において無処置 SHR 群より高値を呈したが有意な差ではなかった。

## 4 考 察

ヒトにおいては加齢に伴い精子発生能が低下し、かつ androgen 産生能が低下する傾向が認められる。精巣の加齢に伴う変化を組織学的に検討すると、精細胞数は減少し、spermatid を含む精細管は 80 歳代では 10% 前後に低下する<sup>9)</sup>。精細胞の支持細胞である Sertoli 細胞にも脂肪滴の増加、細胞の多核化等の変化が生じると報告されている<sup>18)</sup>。同時に精細管壁の collagen は増加し精細管基底膜及び myoid cell 層は肥厚する<sup>1)</sup>。また精細管基底膜の肥厚から閉塞に至り硝子化する精細管の割合も加齢と共に上昇する<sup>7)</sup>。

一方 androgen 産生を司る Leydig 細胞に関しても顕著的に高齢者の Leydig 細胞において核内の Reinke crystal、空胞の含有、細胞内器官の変性、lipofuscin granule の増加等の変化が生じ<sup>4)</sup>、このような退行性変化に伴い testosterone 分泌能が低下することが報告されている<sup>19,20)</sup>。以上のように高齢者においては精細胞及び Leydig 細胞に障害が生じ、精子発生能、androgen 産生能が低下することが知られている。

しかし精巣の機能障害は若年者より発生し始めることも報告されている<sup>21)</sup>。一条らは 40 歳代にはすでに精子細胞を有する精細管は約 50% に低下し、精細管壁の肥厚も 70% に認められると報告している<sup>21)</sup>。

このような精巣組織障害が発生する原因の一つとして精巣内動脈の障害が考えられている。精巣内動脈は 20 歳台よりすでに細動脈の内皮下に硝子様物質が沈着し、内腔を狭窄する硝子化が発生する<sup>2)</sup>。この硝子化は 20 歳台をピークに徐々に減少するが、加齢に伴い動脈硬化性変化が生じてくる。精巣内動脈変化は血管支配の末梢である精巣上極及び精巣上体側の後面に多く認められ、精細管障害の強い部位と一致する<sup>6)</sup>。さらに Suoranta<sup>7)</sup> も精細管が硝子化した部分で精巣内動脈の直径の低下、毛細血管の減少を認めたと報告している。

以上のように比較的若年者から精巣内動脈の血管障害が生じ、精巣内血流障害による精子発生能障害が発生してくる場合もあると考えられる。

20~30 歳代における精子発生不全である男子不妊症は原因不明のことが多いが、やはり血管内皮下の fibrinoid 沈着、硝子化といった精巣内血管障害が生じていることが報告されている<sup>8,9)</sup>。これらの障害部位に一致し精細管の硝子化、閉塞が認められている。さらに精索静脈瘤による男子不妊症例においても血管壁の fibrosis, collagen の沈着が認められる<sup>22)</sup>。

男子不妊症発生病理は不明なものがほとんどで、治療も困難な症例が多い。したがって血管障害と精子発生能障害という視点から発生病理を検討することは臨床意義深いことと考えられる。そこで我々は SHR を用い自然発生に近い血管障害による精子発生能障害の発生病理について解明を試みた。

今回用いた SHR は 1963 年 Okamoto ら<sup>23)</sup> により確立され、本態性高血圧の動物モデルとして広く用いられている。SHR では生後 150 日前後から腎、脳等の細小動脈に fibrinoid necrosis、硝子化等の高血圧性変化が認められる<sup>24)</sup>。中田<sup>25)</sup> は SHR において精巣動脈での non-collagenous protein 代謝、collagen 代謝が亢進しており contractile ability が亢進することにより精巣に虚血性変化が生じることを示唆している。

そこで血管障害の発生頻度を検討してみると、無処置 SHR 群では 12 週齢より徐々にその発生頻度が上昇していた。また小動脈に比し細動脈での血管障害が強く、末梢に近い動脈より障害が発生することが予測された。

ラットにおいて虚血による精子発生能障害についての検討が Oettle & Harrison<sup>10)</sup> により報告されており、精巣動脈を結紮する急性の血流遮断により成熟分化した精細胞ほど虚血に対し敏感であることを示した。一方同様の急性実験で Steinberger & Tjioe<sup>11)</sup> は mitosis を起こす精細胞が最初に虚血に伴い障害されることを報告した。

しかしこれらはいずれも急性実験であり臨床的血管障害性変化とは発生病理が異なる可能性があるため、我々は SHR による徐々にかつ長期にわたる血管障害を起こさせることにより発生する精子発生能障害を検討した。我々は組織学的検討で GCI, Germinal Cell Ratio, PCNA Labeling Index を用いた。まず GCI について検討すると、24 週齢及び 36 週齢の無処置 SHR 群の Mature Spermatid Index が低下しており、成熟した精細胞が高血圧性血管障害に伴う慢性の虚血に対



して最も敏感であることが示された。次に Germinal Cell Ratio を用い、どの精子発生段階が障害されているか検討した。まず Spermatogenic Ratio は 24 週齢及び 36 週齢での無処置 SHR 群において SDR 群に比し有意に低下していた。すなわち無処置 SHR 群では精子発生過程のいずれかの段階で障害されていることが示唆された。さらにどの段階が障害を受けているか検討するため、各成熟段階における精細胞数の比を検討した。Mitotic Ratio 及び Meiotic Ratio では各週齢において差を認めなかったが、Spermiogenic Ratio は 24 週齢、36 週齢の無処置 SHR 群において有意に低下していた。すなわち血管障害に伴う精子発生能障害は spermiogenesis の過程に最も強くかつ早く発生し、mature spermatid の減少につながると考えられた。また精細胞での DNA 合成能を比較検討するため、G1 後期より S 期早期の核小体に局在する PCNA を染色し精細胞の DNA 合成能について検討した。精細胞は順に A 型、I 型、B 型 spermatogonia、休止期 primary spermatocyte へと分化するが、この過程はすべて細胞分裂に際し DNA 合成期が先行するため PCNA 陽性となる<sup>26)</sup>。今回の結果では各群間で PCNA Labeling Index に差を認めなかった。以上の結果より高血圧性血管障害に伴う精子発生能障害は精細胞の DNA 合成能及び mitosis には影響せず、spermiogenesis に最初に現れ mature spermatid が障害されることが明らかとなった。このような 24 週齢及び 36 週齢の無処置 SHR 群における精子発生能障害の程度はかなりの個体差が認められた。その原因として精子発生能障害の強いものは血圧及び高血圧性血管障害の頻度が比較的高い傾向を認め、血管障害の個体差が精子発生能障害に反映されたものと推察された。

Primary spermatocyte 以降の精細胞は Sertoli 細胞間の tight junction により精細管外とは隔絶した環境にあり<sup>27)</sup>、これらの精細胞に対して Sertoli 細胞が lactate 等の栄養供給、paracrine factor の分泌による制御を行っており、支持細胞として働いている。そこで精巣内血管障害により栄養供給が低下する影響がまず Sertoli 細胞に現れると予想し、Sertoli 細胞の分泌蛋白であり paracrine 機構により精細胞を制御している transferrin と IGF-1 を測定した。Transferrin は鉄結合蛋白であり精細胞に鉄を移送している。今回の結果では transferrin はいずれの週齢でも差を認めなかった。この理由は SHR における精子発生能障害が主に spermiogenesis の障害であったのに対し、transferrin が主に pachytene spermatocyte、immature spermatid に

鉄を供給しており<sup>28)</sup>、比較的精子発生能の early phase を反映しているためと予測された。一方、IGF-1 は growth hormone、FSH 等の刺激により Sertoli 細胞よりの分泌が増加することが知られている<sup>29)</sup>。その精細胞に対する作用は、ヒトにおいて secondary spermatocyte 及び early spermatid に receptor が検出されておりこの段階の精細胞分化に関与している可能性が示唆されている<sup>30)</sup>。また Itoh<sup>31)</sup> らは medically hypophysectomized rat において FSH 及び testosterone の補充により精巣内 IGF-1 が上昇し、spermiogenesis の回復と相関することを示した。我々の検討でも IGF-1 は mature spermatid 障害がより強く現れた時期である 36 週齢の無処置 SHR 群で低値を示した。したがって Sertoli 細胞より分泌される IGF-1 が低下したために immature spermatid 以降の精細胞の成熟障害が生じたと考えられる。

以上の血管障害性精子発生能障害を予防することが可能かどうか調べるため、Ca 拮抗薬である nifedipine を予防投与し前述した精子発生能障害の変化を検討した。Nifedipine は他の Ca 拮抗薬に比し血管平滑筋に高い選択性を示し、全身細動脈及び冠動脈を拡張させる<sup>32,33)</sup>と考えられている。SHR では Ca 拮抗薬 (NB-818, nifedipine) により腸管腸動脈瘤の出現、腎硬化を抑制することが報告されている<sup>34)</sup>。今回の結果でも nifedipine は SHR の血圧を低下させ精巣内血管障害の発生を予防していた。しかも nifedipine 投与 SHR 群の精子発生能は全経過中 SDR 群とほぼ同程度の level を維持されていた。nifedipine 投与 SHR 群が SDR 群に比し血管障害が強かったにも関わらず精子発生能が維持されていた理由は、nifedipine の末梢血管拡張作用により血管障害が存在してもある程度血流が維持されていたためか、精子発生能障害に至るには血管障害が軽微で血流が維持されていたためと推測される。

SHR における血管障害に伴う精子発生能障害はヒト、特に男子不妊症に比較すると急激に発症していることは否めないが、精巣動脈を結紮する実験系に比べると自然な経過を検討しているといえる。今回の結果では血管障害が強くなるにつれ Sertoli 細胞分泌蛋白である IGF-1 が低下しており、それに伴い spermiogenesis 過程が障害され mature spermatid 障害が生じていた。すなわち血管障害に伴う血流障害による精子発生能障害は Sertoli 細胞機能低下を介し発生すると予測される。また nifedipine の予防投与により血管障害をある程度抑制し精子発生能障害の発生を予防し得た。これらの事実から SHR においてはやはり血管障害に伴う血流障

害が精子発生能障害の原因であることが確認された。さらに今回の結果より nifedipine 等の Ca 拮抗薬による血管拡張作用が、男子不妊症における血管障害に伴う精子発生能障害に対する治療につながる可能性が示されたと考えられた。

### 参考文献

- Johnson L, Petty CS, Neaves WB. Age-related variation in seminiferous tubules in men. A stereologic evaluation. *J Androl* 1986, 7: 316-322.
- 畠山茂. 人睾丸萎縮の病理. *日病会誌* 1984, 73: 3-29.
- Neaves WB, Johnson L, Petty CS. Age-related change in numbers of other interstitial cells in testes of adult men: Evidence bearing on the fate of Leydig cells lost with increasing age. *Biol Reprod* 1985, 33: 259-269.
- Paniagua R, Amat P, Nistal M, Martin A. Ultrastructure of Leydig cells in human ageing testes. *J Anat* 1986, 146: 173-183.
- Regadera J, Nistal M, Paniagua R. Testis, epididymis, and spermatic cord in elderly men. *Arch Pathol Lab Med* 1985, 109: 663-667.
- Sasano N, Ichijo S. Vascular patterns of the human testis with special reference to its senile changes. *Tohoku J Exp Med* 1969, 99: 269-280.
- Suoranta H. Changes in the small blood vessels of the adult human testis in relation to age and to some pathological conditions. *Virchows Arch [A]* 1971, 352: 165-181.
- 熊本悦明, 寺田雅生. 精子発生不全の発生機序. *医学のあゆみ* 1972, 82: 1020-1027.
- Nasah BT, Cox JN. Vascular lesions in testes associated with male infertility in Cameroon. *Virchows Arch [A]* 1978, 377: 225-236.
- Oettle AG, Harrison RG. The histological changes produced in the rat testis by temporary and permanent occlusion of the testicular artery. *J Pathol Bacteriol* 1952, 64: 273-297.
- Steinberger E, Tjioe D. Spermatogenesis in rat testes after experimental ischemia. *Fertil Steril* 1969, 20: 639-649.
- Stern JA, Lui RC, LAregina MC, Herbold DR, Tolman KC, Johnson FE. Long-term outcome following testicular ischemia in the rat. *J Androl* 1990, 11: 390-395.
- 熊本悦明. 睾丸機能不全の臨床的研究 (第一編 身体医学の問題). *日泌尿会誌* 1963, 54: 1063-1108.
- 寺田雅生. 睾丸機能の研究 第3報 精子発生不全睾丸の精細管内細胞数の研究. (germinal cell index 及び spermatogenic curve を中心にして). *日泌尿会誌* 1973, 64: 930-948.
- Skinner MK, Cosand L, Griswald MD. Purification and characterization of testicular transferrin secreted by rat Sertoli cells. *Biochem J* 1984, 218: 313-320.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72: 248-254.
- Spiteri-Grech J, Bartlett JMS, Nieschlag E. Hormonal regulation of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-1 in adult male hypophysectomized rats treated with ethane dimethane sulphonate. *J Endocrinol* 1991, 129: 109-117.
- Paniagua R, Amat P, Nistal M, Martin A. Ultrastructural changes in Sertoli cells in ageing humans. *Int J Androl* 1985, 8: 295-312.
- 丹田均. 睾丸機能の研究. 第1報 血中 Testosterone 測定による睾丸内分泌機能の検討. *日泌尿会誌* 1971, 62: 925-943.
- 伊藤直樹, 熊本悦明, 赤樫圭吾, 丸田浩, 塚本泰司, 梅原次男, 三熊直人, 山口康宏, 南部明民, 鈴木伸和. 活性型 androgen としての血中遊離 testosterone の検討. *日内分泌会誌* 1991, 67: 23-32.
- 一条貞敏. 血管支配よりみた精巣の老人性変化. *日泌尿会誌* 1969, 60: 304-312.
- Andres TL, Trainer TD, Lapenas DJ. Small vessel alterations in the testes of infertile men with varicocele. *Am J Clin Pathol* 1981, 76: 378-384.
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963, 27: 282-293.
- Hazama F, Ooshima A, Tanaka T, Tomimoto K, Okamoto K. Vascular lesions in the various substrains of spontaneously hypertensive rats and the effects of chronic salt ingestion. *Jpn Circ J* 1975, 39: 7-22.
- 中田瑛浩. 高血圧自然発症ラットの睾丸動脈および睾丸組織の高血圧性変化. —とくに結合組織タンパク質を中心として— *日泌尿会誌* 1984, 75: 927-933.
- Schlatt S, Weinbauer GF. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testes. *Int J Androl* 1994, 17: 214-222.
- Dym M, Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1970, 3: 308-326.
- Toebosch AMW, Kroos MJ, Grootegoed JA.

- Transport of transferrin-bound iron into rat Sertoli cells and spermatids. *Int J Androl* 1987, 10: 753-764.
29. Tres LL, Smith EP, Van Wyk JJ, Kierszenbaum AL. Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin-C in rat Sertoli-spermatogenic cell co-culture. *Exp Cell Res* 1986, 162: 33-50.
30. Vannelli BG, Natali A, Barni T, Serio M, Orlando C, Balboni G. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: An immunohistochemical study. *Fert Steril* 1988, 49: 666-669.
31. Itoh N, Nanbu A, Tachiki H, Akagashi K, Nitta T, Mikuma N, Tsukamoto T, Kumamoto Y. Restoration of testicular transferin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and spermatogenesis by exogenously administered purified FSH and testosterone in medically hypophysectomized rats. *Arch Androl* 1994, 33: 169-177.
32. Fleckenstein A, Tritthart H, Doring HJ, Byon KY. BAY a 1040-A highly active Ca antagonistic inhibitor of the electromechanical coupling process in the warm-blooded myocardium. *Arzneim-Forsch (Drug Res)* 1972, 22: 1-31.
33. Hayase S, Hirasawa S, Hosokawa S, Mori N, Ito H, Kondo Y, Hiei K, Banno S. Basic and clinical studies on BAY a 1040 with special reference to its influence on the coronary, systemic resistance and capacitance blood vessels. *Jpn Circ J* 1971, 35: 903-914.
34. 東野英明, 山西靖子, 菱田守彦, 鈴木有朋. カルシウム拮抗薬 (NB-818) の6月齢 SHRSP に対する降圧および一般薬理作用. *近畿大医誌* 1989, 14: 55-58.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部泌尿器科学教室 赤樫圭吾